

早稲田大学大学院 理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide(PACAP)の
神経幹細胞に対するアストロサイト分化誘導作用の解析

Evidence for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)
promoted differentiation of embryonic neural stem cells into astrocytes

申 請 者

渡邊	潤
Jun	Watanabe

生命理工学専攻 分子生殖生物学研究

2008 年 2 月

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)は、1989年ヒツジ脳の視床下部から下垂体前葉細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化する作用を指標として、単離・同定されたペプチドである。PACAPは中枢神経系・末梢神経系さらには末梢臓器にも発現していることが報告されており、多様な細胞において増殖や分化、細胞死に関与し、さらには内分泌や免疫のシステムを制御していることが明らかとなっている。胎生仔期・新生仔期マウス脳にもPACAPとその特異的受容体(PAC1-R)のmRNAが発現している事が報告されており、特に側脳室周囲、海馬、嗅球、小脳などの領域に発現が強く見られる。これらの領域には神経幹細胞が存在し、増殖と分化を活発に行っていることが知られている。神経幹細胞は、自己増殖能とニューロンやアストロサイトに分化する多分化能を有する細胞で、近年その存在が成体脳にも発見され再生医学・医療などに結びつくことから、注目されている細胞である。PACAPは神経幹細胞に何らかの作用を及ぼしていると考えられるが、その役割についてはほとんど知られていない。そこで本研究では、PACAPが神経幹細胞の分化や増殖に対してどのような作用を持っているのかを明らかにすることを目的とし、胎生14.5日マウス終脳由来の培養神経幹細胞を用いてPACAPの神経幹細胞に対する作用を*in vitro*で機能形態学的に解析した。さらに*in vivo*でもその作用を確認した。

第1章ではPACAPと神経幹細胞に関するこれまでの様々な研究結果を解説し、更に本研究の目的に到達するまでの背景について述べる。

第2章では初代神経幹細胞の単層培養法の確立について述べる。神経幹細胞の培養法には主に2つの方法が知られている。1つは細胞を凝集体の形で培養する方法でneurosphere法と呼ばれる。この方法は神経幹細胞を長時間維持することができるが、凝集体には幹細胞以外の分化した細胞も多く含まれる。もう1つが単層培養法で、この方法は高純度の神経幹細胞を得ることができるが、継代を繰り返すと分化が進むことが知られている。本研究においては、PACAPの神経幹細胞に対する作用を解析するため、単層培養法を選択した。ただし継代培養は1回のみ行った。胎生14.5日マウス終脳の神経上皮細胞をbasic fibroblast growth factor (bFGF)存在下で4日間培養すると、神経幹細胞のマーカーであるnestinに85%以上の細胞が陽性となった。また、この細胞は神経幹細胞の特徴である自己増殖能と、ニューロンやアストロサイトに分化する多分化能を有していた。以下この方法で培養した神経幹細胞を本実験に用いた。

第3章ではPACAPを培養神経幹細胞に加え、その作用を増殖、分化、細胞死抑制の観点から解析した結果を述べる。イムノブロットとRT-PCRにより培養神経幹細胞にPAC1-Rが発現していることを観察した。2 nMのPACAP存在下で8日間培養すると、神経幹細胞はその55%がglial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性のアストロサイトへと分化することが明らかとなった。このときGFAP陽性細胞は培養4日目くらいから増加した。またこの分化誘導作用はPAC1-Rのアン

タゴニストである PACAP₆₋₃₈ によって有意に阻害された。次に PACAP による神経幹細胞の増殖への影響を調べた。増殖細胞のマーカーである Ki67 に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、control 群と PACAP 投与群で Ki67 免疫陽性細胞の割合に差異はみられなかった。PACAP が神経幹細胞の分化ではなくアストロサイトを特異的に増殖させていることも考えられたため、GFAP と Ki67 の二重免疫染色を行った。GFAP および Ki67 の免疫陽性反応は重ならなかった。この結果から、PACAP は神経幹細胞の増殖よりも分化に関与することが考えられる。一方、control 群に比べて PACAP 投与群では細胞数の増加が観察された。そこで細胞死に対する PACAP の影響をしらべた。核の断片化、凝集化を指標に死んだ細胞数を計測すると、PACAP 投与群では培養 4 日目で細胞死の有意な抑制が観察された。以上の実験観察結果から、PACAP は神経幹細胞に対して分化誘導作用と細胞死抑制作用の 2 つを有していることが明らかとなった。

第 4 章では PACAP による分化誘導の細胞内シグナル伝達経路について述べる。RT-PCR により培養神経幹細胞は PAC1-R の short form と long form の両方のサブタイプを発現していた。このことから、神経幹細胞に対する PACAP のシグナル伝達経路は少なくとも 2 つあると考えられる。1 つは short form の PAC1-R に結合した Gs タンパク質が adenylate cyclase (AC) の活性化を行い、次いで cAMP 産生、protein kinase A (PKA) の活性化が起きる Gs 経路である。もう 1 つは long form の PAC1-R に結合した Gq タンパク質が phospholipase C (PLC) の活性化を行い、phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂) からの inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) と diacylglycerol (DG) の産生、Ca²⁺ の動員、protein kinase C (PKC) の活性化が起きる Gq 経路である。そこでこの 2 つの経路のどちらが神経幹細胞の分化誘導に関与しているかを解析した。cAMP の細胞膜透過性アナログである dibutyryl cAMP と 8Br-cAMP はともにアストロサイトへの分化を誘導しなかった。また PKA の阻害剤である Rp-cAMP は PACAP による分化誘導を抑制しなかった。これらの結果から、Gs 経路は神経幹細胞の分化誘導に関与しないと考えられる。

一方、PKC 特異的阻害剤である chelerythrine が PACAP による分化を抑制することが認められ、またリン脂質依存 PKC 活性化剤である PMA は PACAP と同程度の分化誘導を引き起こすことが分かった。さらに細胞内 Ca²⁺ キレーターである BAPTA-AM や PLC の阻害剤である U73122 が神経幹細胞の分化を抑制することが観察された。以上の実験観察結果から、PACAP は Gq 経路を介して神経幹細胞からアストロサイトへの分化を誘導していることが明らかとなった。さらに PKC family の中で、リン脂質、Ca²⁺ 依存性 PKC (cPKC) 分子の細胞分化への関与が示唆された。そこで神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導時の cPKC の役割についてしらべた。cPKC には 3 つのサブタイプ (α , β , γ) が存在するが、PKC γ は神経幹細胞には mRNA、タンパク質ともに検出できなかった。一方 PKC α

のタンパク質発現が分化誘導と並行して上昇すること、PKC β のタンパク質発現が細胞の形態変化に先立って一過性に上昇することが確認された。そこでアデノウイルスを用いて PKC α と PKC β の強制発現系を構築し、アストロサイトへの分化誘導に対する影響をしらべた。予想に反して PKC α と PKC β の強制発現はそれだけでは細胞分化を誘導しなかった。しかし PKC α と PKC β が強制発現された細胞は、より低濃度の PACAP で分化誘導を引き起こすことが明らかとなった。その効果は PKC β を強制発現したときのほうがより顕著であった。この結果から、アストロサイトへの分化誘導過程において PKC α と PKC β のタンパク質発現の増加だけではなく、その活性化が重要であると考えられる。さらに PKC β の不活性化体を強制発現させると、神経幹細胞からアストロサイトへの分化が抑制された。以上の研究結果より、cPKC の活性化が神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導に重要であり、特に PKC β が大きな役割を担っていることが明らかとなった。

第5章では *in vivo* での PACAP によるアストロサイトの分化誘導の可能性について述べる。まずマウスの胎仔期、新生仔期の神経発生における PAC1-R の分布・局在を免疫組織化学的にしらべた。PAC1-R の免疫陽性反応は神経幹細胞のマーカーである nestin、ラジアルグリアのマーカーである vimentin の免疫陽性反応と重なった。GFAP 陽性細胞は胎生 16 日から側脳室周囲に出現し、胎生期から生後にかけて側脳室周囲と海馬周辺に強い免疫陽性反応が観察された。PAC1-R が神経幹細胞およびラジアルグリアに発現し、その領域から GFAP 陽性のアストロサイトが出現することから、PACAP が神経幹細胞に作用してラジアルグリアやアストロサイトへと分化誘導させる可能性が考えられる。そこで胎生 13.5 日のマウス胎仔の脳室に高濃度(100 pmol)の PACAP を注入し、1 日後にその終脳を摘出し、培養皿に細胞を播き 1 時間後に細胞を固定して免疫染色による細胞同定を行った。神経幹細胞のマーカーである nestin 陽性細胞の比率の減少と、ラジアルグリアのマーカーである GLAST 陽性細胞の比率の増加が観察された。以上の実験観察結果から、PACAP は *in vivo* において神経幹細胞からラジアルグリアを介してアストロサイトへの分化誘導に関与している可能性が考えられる。

第6章では本研究により得られた結論、並びに今後の展望について述べる。本研究により、1)PACAP が神経幹細胞からアストロサイトへの分化誘導を促進すること、2)そのシグナル伝達経路が PLC, Ca²⁺, PKC を介する Gq 経路であること、3)PKC のサブタイプのうち PKC β が分化誘導に重要な役割を担っていること、4)*in vivo* においても、胎生期の PACAP は神経幹細胞からラジアルグリアを介したアストロサイトへの分化誘導に関与している可能性が明らかになった。

今後の研究展開としては、PACAP KO マウス、PAC1-R KO マウスを用いた機能形態学的解析が課題としてあげられる。今後、PACAP による神経幹細胞から種々の細胞種への分化誘導機構を解析するとともに、細胞内情報伝達機構を含めた作用機序の解明に向けた研究を進めていく予定である。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 渡邊 潤 印

(2008 年 2 月 9 日 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
原著論文	<p>○ 1. Involvement of protein kinase C in the PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes. Ann N Y Acad Sci. 2006, 1070: 597-601. Watanabe J, Ohno F, Shioda S, Kikuyama S, Nakaya K, Nakajo S.</p> <p>○ 2. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced differentiation of embryonic neural stem cells into astrocytes is mediated via the beta isoform of protein kinase C. J Neurosci Res. 2006, 84: 1645-1655. Watanabe J, Ohba M, Ohno F, Kikuyama S, Nakamura M, Nakaya K, Arimura A, Shioda S, Nakajo S.</p> <p>3. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) type 1 receptor (PAC1R) colocalize with activity - dependent neuroprotective protein (ADNP) in the mouse brain. Regul Pept 2007, Epub ahead of print. Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, Dohi K, Watanabe J, Hayashi D, Matsuno R, Nonaka N, Itabashi K, Shioda S.</p> <p>4. Distribution and localization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide - specific receptor (PAC1R) in the rostral migratory stream of the infant mouse brain. Regul Pept. 2007, Epub ahead of print. Matsuno R, Ohtaki H, Nakamachi T, Watanabe J, Yofu S, Hayashi D, Takeda T, Nonaka N, Seki M, Nakamura M, Itabashi K, Shioda S</p> <p>5. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes differentiation of mouse neural stem cells into astrocytes. Regul Pept. 2005, 126:115-122. Ohno F, Watanabe J, Sekihara H, Hirabayashi T, Arata S, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S.</p> <p>6. Monoaminergic neuronal development is not affected in PACAP-gene-deficient mice. Regul Pept. 2005, 126: 103-108. Ogawa T, Nakamachi T, Ohtaki H, Hashimoto H, N S, Baba A, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S.</p> <p>7. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 (PACAP38) on tissue oxygen content--treatment in central nervous system of mice. Regul Pept. 2004, 123: 61-67. Ohtaki H, Dohi K, Yofu S, Nakamachi T, Kudo Y, Endo S, Aruga T, Goto N, Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S.</p> <p>8. A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes. Neurosci Res. 2003, 47:451-454. Suzuki R, Watanabe J, Arata S, Funahashi H, Kikuyama S, Shioda S.</p>
著書(分担執筆)	<p>1. Involvement of β isoform of PKC in PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes. New Frontiers in Regenerative Medicine. Springer-Verlag Tokyo. 2006: 121-34. Nakajo S, Watanabe J, Ohba M, Ohno F, Kikuyama S, Nakaya K, Shioda S.</p> <p>2. Differentiation of Neural Stem Cells into Astrocytes by Low Concentration of Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP). Breathing, Feeding, and Neuroprotection. Springer-Verlag Tokyo. 2005: 57-63. Watanabe J, Shioda S, Kikuyama S, Nakaya K, Nakajo S</p>
総説	<p>1. Localization, characterization and function of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide during brain development. Peptides. 2007, 28:1713-1719. Watanabe J, Nakamachi T, Matsuno R, Hayashi D, Nakamura M, Kikuyama S, Nakajo S, Shioda S.</p> <p>2. Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. Ann N Y Acad Sci. 2006, 1070:550-560. Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Watanabe J, Nakajo S, Arata S, Kitamura S, Okuda H, Takenoya F, Kitamura Y.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学会 発表	<ol style="list-style-type: none"> 1. Involvement of beta isoform of protein kinase C in the PACAP-induced differentiation of neural stem cells into astrocytes. Society for Neuroscience (37th Annual Meeting), San Diego, California, Nov. 3-7, 2007. Watanabe J, Nakamachi T, Hayashi D, Nakamura M, Nakajo S, Shida S. 2. in vitro 及び in vivo における PACAP の神経幹細胞に対するアストロサイト分化誘導作用. 第 32 回日本比較内分泌学会大会. Oct. 12-13, 2007. 渡邊 潤、中町智哉、中村正久、中条茂男、塩田清二. 3. THE ROLE OF PACAP IN ASTROGLIAL DIFFERENTIATION <i>IN VIVO</i> AND <i>IN VITRO</i>. 8th International Symposium for VIP, PACAP and Related Peptides. Manchester, Vermont. Sep. 4-7, 2007. Watanabe J, Nakamachi T, Hayashi D, Nakamura M, Nakajo S, Shioda S. 4. PACAP の神経幹細胞に対するアストロサイト分化誘導作用の解析. 第 4 回 GPCR 研究会. 東京, May. 11, 2007. (研究会) 渡邊 潤、中町 智哉、林 大祐、松野 良介、中村 正久、中条 茂男、塩田 清二. 5. 胎仔期、新生仔期マウス脳のアストロサイト発生過程における PAC1-R の分布局在. 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術大会. 大阪. Mar. 27-29, 2007. 渡邊 潤、中町智哉、林大祐、松野良介、中村正久、中条茂男、塩田清二. 6. 神経幹細胞はメチル水銀毒性に対して高い感受性を示す. 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術大会. 大阪. Mar. 27-29, 2007. 渡邊 潤、小川哲郎、中町智哉、永沼 章、中村正久、塩田清二、中条茂男. 7. Neural immature progenitor cells have high sensitivity to methyl mercury. Involvement of reactive oxidative stress. Society for Neuroscience (36th Annual Meeting), Atlanta, Georgia, Oct. 14-18, 2006. Watanabe J, Ogawa T, Naganuma A, Nakamura M, Shioda S, Nakajo S. 8. PACAP induces differentiation of neural stem cells into astrocytes: Involvement of the β isoform of protein kinase C. Half-Day Symposium on G protein-Coupled Receptors (GPCR): Satellite Symposium of REGPEP'06. Hakone, Aug. 30-Sep. 2, 2006. Watanabe J, Ohba M, Ohno F, Kikuyama S, Nakamura M, Shioda S, Nakajo S. 9. 神経幹細胞における PACAP の分化誘導作用. 第 3 回 GPCR 研究会. 東京, May. 13, 2006. (研究会) 渡邊 潤、大場 基、大野 総子、中村 正久、塩田 清二、中条 茂男. 10. 神経幹細胞のアストロサイトへの分化誘導機構の解析: PACAP シグナル伝達における cPKC の関与. 第 111 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 神奈川, Mar. 29-31, 2006. 渡邊 潤、大野総子、塩田清二、菊山 榮、中谷一泰、中条茂男. 11. Differentiation of neural stem cells into astrocytes by PACAP: involvement of protein kinase C in the signaling pathway. The 7th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Rouen, France, Sep. 11-15, 2005. Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S. 12. Signaling pathway of PACAP which induces differentiation of neural stem cells into astrocytes. Society for Neuroscience (34th Annual Meeting), San Diego, California, Oct. 23-27, 2004. Watanabe J, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S. 13. Involvement of Gq signaling pathway in the differentiation of neural stem cells into astrocytes by PACAP. Showa University International Symposium for Life Sciences, 1st Annual Meeting New Frontiers in Neuroscience Research Tokyo Japan, Aug. 31, 2004. Watanabe J, Ohno F, Kikuyama S, Shioda S, Nakaya K, Nakajo S.